

METODA SYMULOWANEGO WYŻARZANIA – ZASTOSOWANIE DO BADANIA STRUKTURY I DYNAMIKI BIAŁEK*

SIMULATED ANNEALING METHOD – AN APPLICATION TO INVESTIGATE STRUCTURE AND DYNAMICS OF PROTEINS

Grzegorz JEZERSKI, Marta PASENKIEWICZ-GIERULA

Zakład Biofizyki, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Symulowane wyżarzanie jest metodą obliczeniową, stosowaną zarówno w procesie rozwiązywania struktury białczeczek, jak również w modelowaniu struktury i dynamiki tych związków. Metoda ta stanowi wariant symulacji dynamiki molekularnej i jako taka zakłada klasyczne traktowanie atomów w badanym układzie. Stosuje się tutaj dodatkowe techniki pozwalające na lepszą penetrację przestrzeni konfiguracyjnej układu, m.in. podwyższenie temperatury. W pracy badano wpływ wymiany aminokwasu w antytrypsynie na strukturę jego mikrootoczenia i dynamikę całej cząsteczki białka. Podano także przykłady zastosowania tej metody w projektowaniu leków. Omówiono wady i zalety metody oraz wskazano na inne zastosowania, np. symulację zwijania białek. Praca oparta jest na wynikach badań własnych oraz na danych literaturowych pochodzących głównie z ostatnich dziesięciu lat i stanowiących ilustrację nowych trendów w dziedzinie symulacji białek metodami symulacji komputerowej.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; supl. 16: 305–317)

Słowa kluczowe: modelowanie molekularne, symulacja dynamiki molekularnej, projektowanie leków, struktura białek, α_1 -antytrypsyna, kąty ψ i ϕ

Summary: Simulated annealing is a method applied to solve structures of biomolecules, as well as for modelling the structure and dynamics of these compounds. This method is a variation of a molecular dynamics method, and as such, it assumes classical treatment of atoms. Additional techniques, such as increasing temperature in a model system, which allow for better penetration of configurational space, are applied. The simulation of the influence of an aminoacid exchange in antitrypsin on the structure in

*Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych, nr projektu badawczego 4 P05A 081 14. Obliczenia opisane w rozdziałach 3.1 i 3.2 wykonano w Interdyscyplinarnym Centrum Modelowania Matematycznego Uniwersytetu Warszawskiego.

the aminoacid's vicinity and on the dynamics of the protein has been investigated. Advantages and disadvantages of the method have been discussed; examples of applications of the method in drug design are given, eg. simulation of protein folding. This paper describes original and cited results, published mainly during the last decade and reflecting new trends in the field of protein simulation by means of computer simulation.

(*Advances in Cell Biology* 2001; suppl. 16: 305–317)

Keywords: molecular modelling, molecular dynamics simulation, drug design, protein structure, α_1 -antitrypsin, ψ and ϕ angles

Wykaz skrótów: **AMBER** – Assisted Model Building for Energy Refinement; **HIV** – Human Immunodeficiency Virus; **NMR** – Nuclear Magnetic Resonance; **OPLS** – Optimized Potentials for Liquid Simulations; **RMSD** – Root Mean Square Displacement; **VAC** – N,N-bis(2(R)-hydroxy-1(S)-indanyl)-2,6-(R,R)-diphenylmethyl-4-hydroxy-1,7-heptandiamide.

1. WSTĘP

Symulacja dynamiki molekularnej jest metodą obliczeniową wykorzystywaną do badania struktury i dynamiki biocząsteczek, począwszy od końca lat siedemdziesiątych [14, 24]. Wariantem tej metody jest symulowane wyżarzanie (ang. *simulated annealing*). Jest to metoda optymalizacji, zastosowana po raz pierwszy przez Kirkpatricka [16] do rozwiązywania „problemu komiwojażera”¹ i wywodzi się z metody Monte Carlo.

Metoda Monte Carlo polega na losowaniu konfiguracji w danym układzie – przestrzeni konfiguracyjnej, a następnie weryfikacji uzyskanych konfiguracji określonymi metodami tak, aby uzyskać zbiór konfiguracji „najlepszych” pod względem żadanego kryterium [26]. Przykładem zastosowania metody Monte Carlo w biologii strukturalnej jest analiza stabilnych konformacji cząsteczki podczas zwijania białka [20].

Ideą metody symulowanego wyżarzania jest osiągnięcie stanu podstawowego badanego układu (np. modelowej cząsteczki białka) reprezentowanego z reguły przez globalne minimum energii potencjalnej. Procedura dochodzenia do stanu podstawowego odbywa się poprzez penetrację przestrzeni konfiguracyjnej układu, którą w przypadku białek stanowi zbiór dozwolonych konformerów.

Zastosowania metody Kirkpatricka do modelowania białek okazały się skuteczne w ich badaniu zarówno metodami rentgenograficznymi [4, 15], jak i jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) [5, 9, 30].

¹Problem komiwojażera polega na wyznaczeniu najkrótszej drogi przechodzącej dokładnie raz przez każde miasto ze zbioru N miast (punktów przestrzeni fazowej), przy czym punkt początkowy i końcowy drogi leży w tym samym mieście [31].

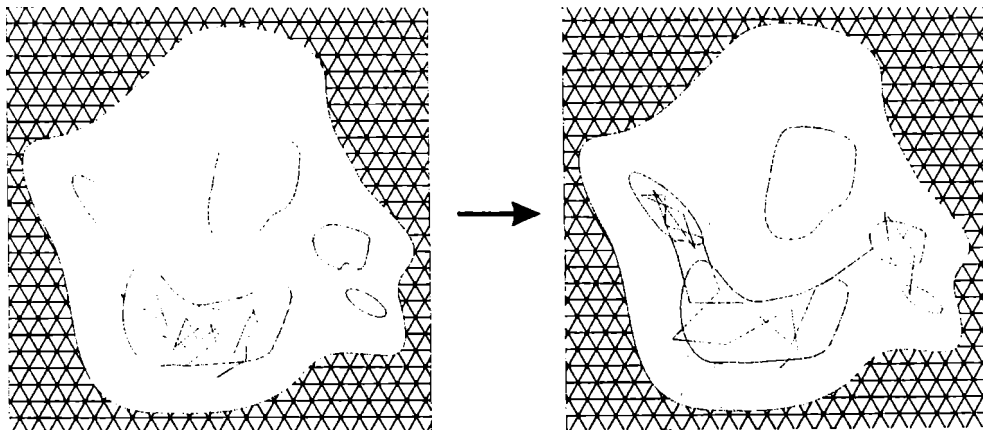
2. METODA SYMULOWANEGO WYŻARZANIA

Symulacja dynamiki molekularnej polega na wyznaczaniu trajektorii zbioru cząstek w przestrzeni przez obliczanie położenia i prędkości wszystkich atomów w kolejnych krokach czasowych (iteracjach)². Symulowane wyżarzanie jest wariantem symulacji dynamiki molekularnej, w którym zmieniamy parametry obliczeń tak, aby układ osiągnął większą „swobodę”. W istocie więc, modyfikujemy trajektorie układu. Modyfikację trajektorii $\Gamma(t)$ atomów w układzie można wyrazić wzorem:

$$\hat{O}\Gamma(t) = \Gamma'(t) \quad (2-1)$$

gdzie: operator \hat{O} oznacza skalowanie pewnych parametrów symulacji; są to najczęściej: zmiana (głównie zwiększenie) temperatury układu według zadanego profilu czasowego, zmniejszenie masy atomów bądź modyfikacja funkcji potencjału. Otrzymana trajektoria $\Gamma'(t)$ różni się od $\Gamma(t)$ zdolnością penetracji przestrzeni konfiguracyjnej. Różnice w trajektoriach przedstawiono na rysunku 1. Prócz tego, w obliczeniach metodą symulowanego wyżarzania nie stosuje się rozpuszczalnika *explicit*, a jedynie modelowanie uśrednionego efektu rozpuszczalnika.

Wykorzystywane w symulowanym wyżarzaniu białek techniki zapobiegają „zniszczeniu” modelu białka. W tym celu nakłada się więzy, czyli dodatkowy potencjał „ograniczający” (ang. *restraints*) na niektóre odcinki łańcucha polipeptydowego.



RYSUNEK 1. Przykładowe trajektorie cząstki w symulacjach: dynamiki molekularnej i symulowanego wyżarzania (odpowiednio: kwadrat po lewej i prawej stronie): Jasne obszary oznaczają fragmenty przestrzeni konfiguracyjnej o niskiej energii potencjalnej; ciemniejsze – wysokiej (bariera potencjału). Pozostały obszar jest zabroniony dla cząstki. Widoczna jest różnica w zdolności penetracji przestrzeni konfiguracyjnej przez obie techniki

²Podstawy dynamiki molekularnej zostały przystępnie omówione w [11]; szersze omówienie znajduje się w pracy [19].

W przypadku symulacji opisanych w rozdziale 3.2 technikę tę zastosowano, aby zachować trzeciorzędową i w większości przypadków drugorzędową strukturę białka, nie zaburzając jednocześnie swobodnych ruchów cząsteczki. Technika ta oraz techniki jej pokrewne są powszechnie stosowane przy określaniu struktury przestrzennej białek [21].

Metoda symulowanego wyżarzania pozwala na skuteczniejszą penetrację przestrzeni konfiguracyjnej niż symulacja dynamiki molekularnej bez zastosowania wyżej wspomnianych modyfikacji parametrów symulacji lub układu. Symulowane wyżarzanie stosowane jest do rozwiązywania następujących problemów:

- Udokładnianie struktury białka otrzymanej z widma NMR bądź dyfraktogramu (patrz rozdz. 1).
- Wpływ mutacji aminokwasowej na strukturę i dynamikę białka (patrz rozdz. 3).
- Projektowanie leków (patrz rozdz. 4).
- Symulacja zwijania białek [25, 27].
- Przewidywanie struktury białka i tworzenie mapy energii potencjalnej cząsteczki [21, 34].

3. SYMULACJA MUTACJI W ANTYTRYPSYNIE

3.1. Antytrypsyna – struktura i mutacja Z

Ludzka α_1 -antytrypsyna (α_1 PI, α_1 -antyproteinaza) jest inhibitorem proteaz serynowych należącym do grupy serpin [8, 29]. Cechy strukturalne o dużym znaczeniu dla funkcji α_1 -antytrypsyny to: eksponowana do roztworu pętla reaktywna, na której mieści się centrum reakcji inhibicji, duży arkusz β (A) i mały arkusz β (C). Pętla reaktywna łączy arkusze A i C [7, 22]. Białko to w warunkach fizjologicznych występuje w kilku konformacjach. Konformacja zdolna do inhibicji proteazy nazywana jest formą natywną; istnieje również forma cięta, powstała w wyniku hydrolizy wiązania peptydowego w łańcuchu pętli reaktywnej.

Najczęściej występującą formą patologiczną ludzkiej α_1 -antytrypsyny jest mutant Z – Glu342Lys. Mutacja ta implikuje brak mostka solnego Glu342-Lys290, co z kolei powoduje polimeryzację cząsteczek białka. Badania metodami fluorescencyjnymi dowodzą istnienia dwóch mechanizmów tworzenia kompleksów mutantu antytrypsyny, jak również istnienia stadium pośredniego dimeru [17, 18, 23]. Mechanizm agregacji cząsteczek pozostaje jednak nieznany. Istotne jest więc zbadanie wpływu mutacji Glu342Lys na strukturę i dynamikę antytrypsyny; zastosowanie technik obliczeniowych jest tu korzystne ze względu na ograniczone możliwości

³Użyty został termin „dziki typ” będący bezpośrednim tłumaczeniem terminu *wild type*, spotykanego w literaturze anglojęzycznej.

badania agregatów tego białka przy pomocy technik rezonansowych czy dyfrakcyjnych.

3.2. Procedura symulowanego wyżarzania

W strukturze krystalicznej α_1 -antytrypsyny rozwiązanej przez Elliotta i wsp. [7] dokonano wymiany kwasu glutaminowego 342 na lizynę. W celu uzyskania struktury wyjściowej do symulacji przeprowadzono minimalizację energii obu modeli białka: mutanta Z oraz dzikiego typu³, który stanowi strukturę odniesienia.

W celu wygenerowania struktur dynamicznych białka, modele otrzymane po minimalizacji energii poddano symulowanemu wyżarzaniu. W symulacjach stosowano klasyczne pole siłowe OPLS [13]; obliczenia przeprowadzono programem AMBER4.1 [28]. Temperaturę kontrolowano metodą Berendsena [2]. Środowisko wodne imitowano stosując zależną od odległości „stałą” dielektryczną w potencjale kulombowskim. Postępowanie takie, w przypadku symulowanego wyżarzania, pozwala uniknąć destabilizacji struktury białka na skutek oddziaływania z cząsteczkami wody w temperaturze znacznie wyższej niż fizjologiczna.

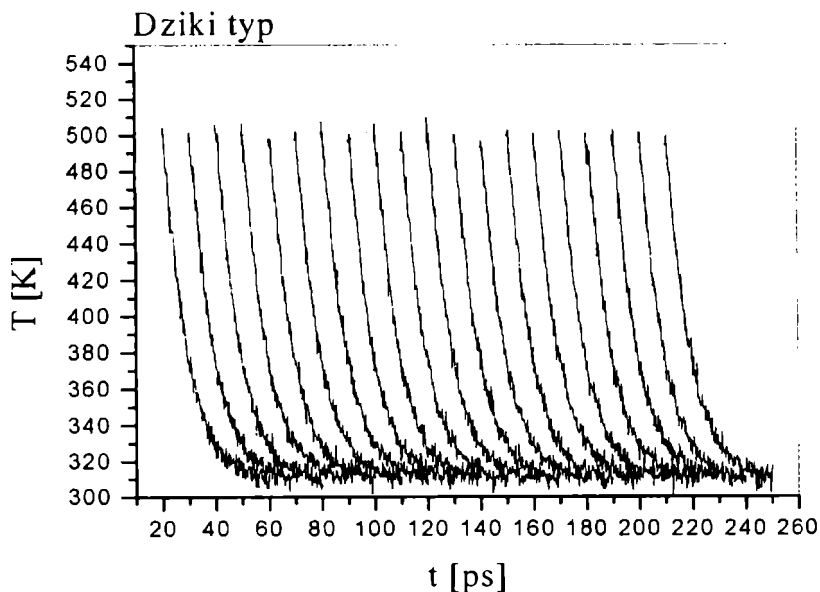
Symulacja dynamiki molekularnej obu modeli α_1 -antytrypsyny składała się z trzech etapów:

- A. Podgrzewanie: temperatura układu została liniowo w czasie zwiększona od 10 K do 500 K (czas symulacji: 10 ps).
- B. Dynamika wysokotemperaturowa: utrzymywano stałą temperaturę 500 K (czas symulacji: 200 ps).
- C. Schładzanie: otrzymywaną co 10 ps podczas symulacji wysokotemperaturowej (etap B) strukturę dynamiczną białka poddawano symulacji przy jednoczesnym eksponencjalnym obniżaniu temperatury. Końcowy odcinek tego etapu symulacji pozwala na „równoważenie” struktury w temperaturze bliskiej fizjologicznej. W ten sposób otrzymano 20 struktur pośrednich.

Wykres temperatury białka w funkcji czasu symulacji dla etapów symulacji B i C przedstawiono na rysunku 2.

Zależność energii całkowitej dla dzikiego typu i mutanta od czasu symulacji wysokotemperaturowej (etap B) przedstawiono na rysunkach 3a i b. Zależności te dla obu form białka wykazują znaczne różnice, pomimo że wymieniono jedynie jedną resztę aminokwasową w białku zawierającym 375 reszt. Wykresy zależności energii całkowitej i kinetycznej⁴ od czasu symulacji w procesie schładzania (etap C) przedstawiono na rysunkach 3c i d.

⁴Temperatura jednoatomowego gazu doskonałego jest wprost proporcjonalna do średniej energii kinetycznej cząstek tego gazu; taki gaz jednak w przyrodzie nie występuje [1]. W symulacjach białek przyjmuje się, że temperaturę można obliczać opierając się na teorii gazu doskonałego, jest to więc wartość przybliżona.



RYSUNEK 2. Zależność temperatury od czasu w symulacji dzikiego typu. Wykres odnosi się do etapu dynamiki wysokotemperaturowej (jasna linia) oraz 20 cykli schładzania do temperatury fizjologicznej (ciemna linia)

3.3. Optimalizacja struktur otrzymanych podczas symulowanego wyżarzania

Struktury białka otrzymane w wyniku symulowanego wyżarzania poddano minimalizacji energii w celu otrzymania bardziej optymalnych (stabilnych) konformacji. Spośród zoptymalizowanych modeli wybrano ten, który charakteryzował się najniższą wartością energii potencjalnej i jej gradientu. Dla typu dzikiego otrzymano ją po 230 ps symulacji, a dla mutantu – po 190 ps.

Porównanie struktur zoptymalizowanych dzikiego typu i mutantu wskazuje na ich znaczną rozbieżność jedynie w obszarze Lys290 i fragmentu pętli reaktywnej (rys. 4), co wynika z braku przyciągania elektrostatycznego między resztami Lys342 i Lys290 w białku zmutowanym. Stanowi to podstawę dla hipotezy, że zmiana wywołana tą mutacją ma charakter głównie dynamiczny. Modyfikacji ulega stopień ruchliwości poszczególnych aminokwasów, jak również zmienia się skład domen wykazujących kolektywne ruchy. Struktury krystaliczne zarówno mutantów α_1 -antytrypsyny w formie natywnej [7, 32], jak i polimerów tego białka w formie ciętej [8, 10] wykazują niewielkie rozbieżności strukturalne. Nie dostarczają one jednak informacji odnośnie różnic w dynamice dzikiego typu i mutantów.

3.4. Analiza przeprowadzonych symulacji

Z przeprowadzonej analizy mikrootoczenia Lys290 w α_1 -antytrypsynie wynika, że w typie dzikim oddziaływanie przyciągające Glu342Lys jest trwałe w trakcie dynamiki w temperaturze 500 K, w przeciwieństwie do mutantu Z [12]. Obliczono również wartości RMSD (ang. *Root Mean Square Displacement*) między strukturami otrzymanymi w kolejnych cyklach schładzania (etap C), a następnie zoptymalizowanymi. Analiza ta dostarcza informacji o stopniu zróżnicowania struktur otrzymywanych w kolejnych cyklach symulacji. Jak wynika z tej analizy, struktury o niskim stopniu zróżnicowania względem struktur otrzymywanych w innych cyklach symulacji korespondują ze strukturami zoptymalizowanymi o najniższej energii.

Badanie modelu mutantu Z ludzkiej α_1 -antytrypsyny metodą symulowanego wyżarzania wykazało efekt zmian w energii cząsteczki (a więc i w jej stabilności), indukowanych zerwaniem „mostka solnego” Glu342Lys.

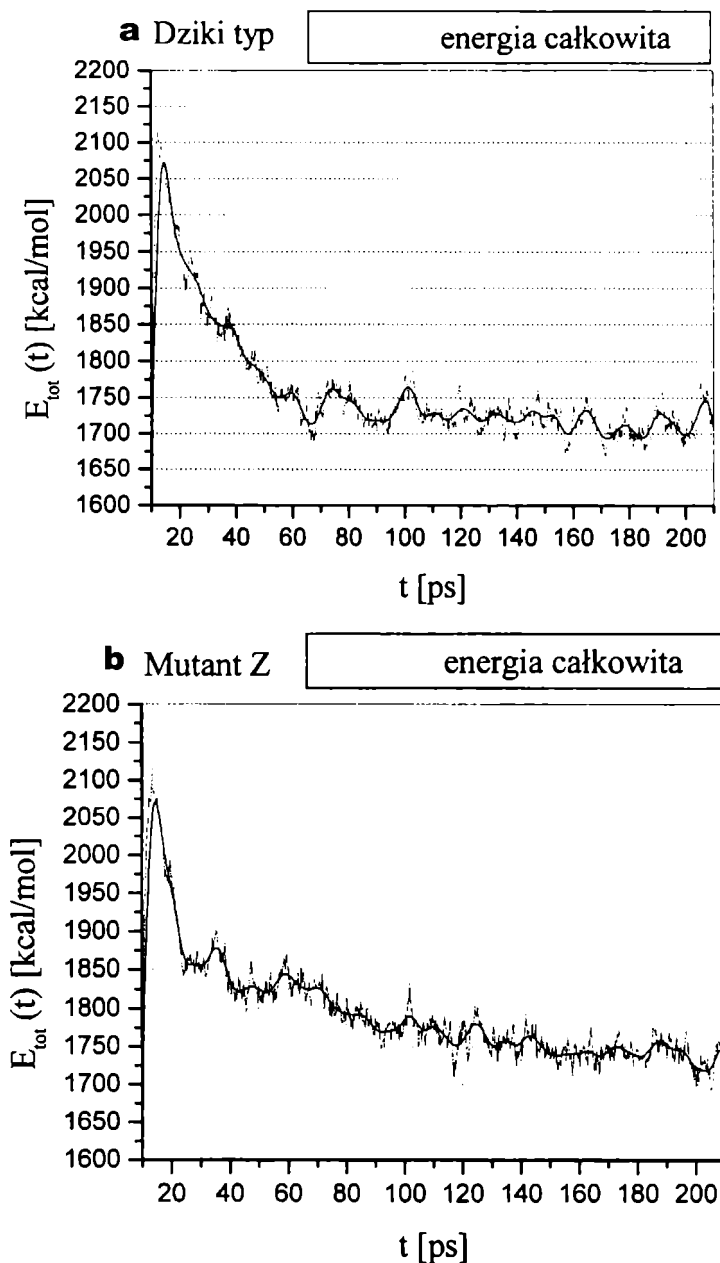
4. MODELOWANIE KOMPLEKSÓW BIAŁKA Z LIGANDAMI ŚREDNIOCZĄSTECZKOWYMI

Komputerowo wspomagane projektowanie leków (ang. *Computer Aided Drug Design*) stało się obecnie standardową procedurą przy wytwarzaniu nowego leku [3]. Najczęściej stosuje się tu dokowanie⁵ odpowiedniej liczby proponowanych struktur wybranych z baz danych w miejscu aktywnym białka oraz metody obliczeniowe, głównie minimalizację energii. Jednak w przypadku, gdy struktura proponowanego leku (liganda) jest skomplikowana, konieczne jest zwiększenie skuteczności penetracji przestrzeni konformacyjnej liganda przez zastosowanie metody symulowanego wyżarzania (mamy do czynienia z większą potencjalną liczbą konformacji).

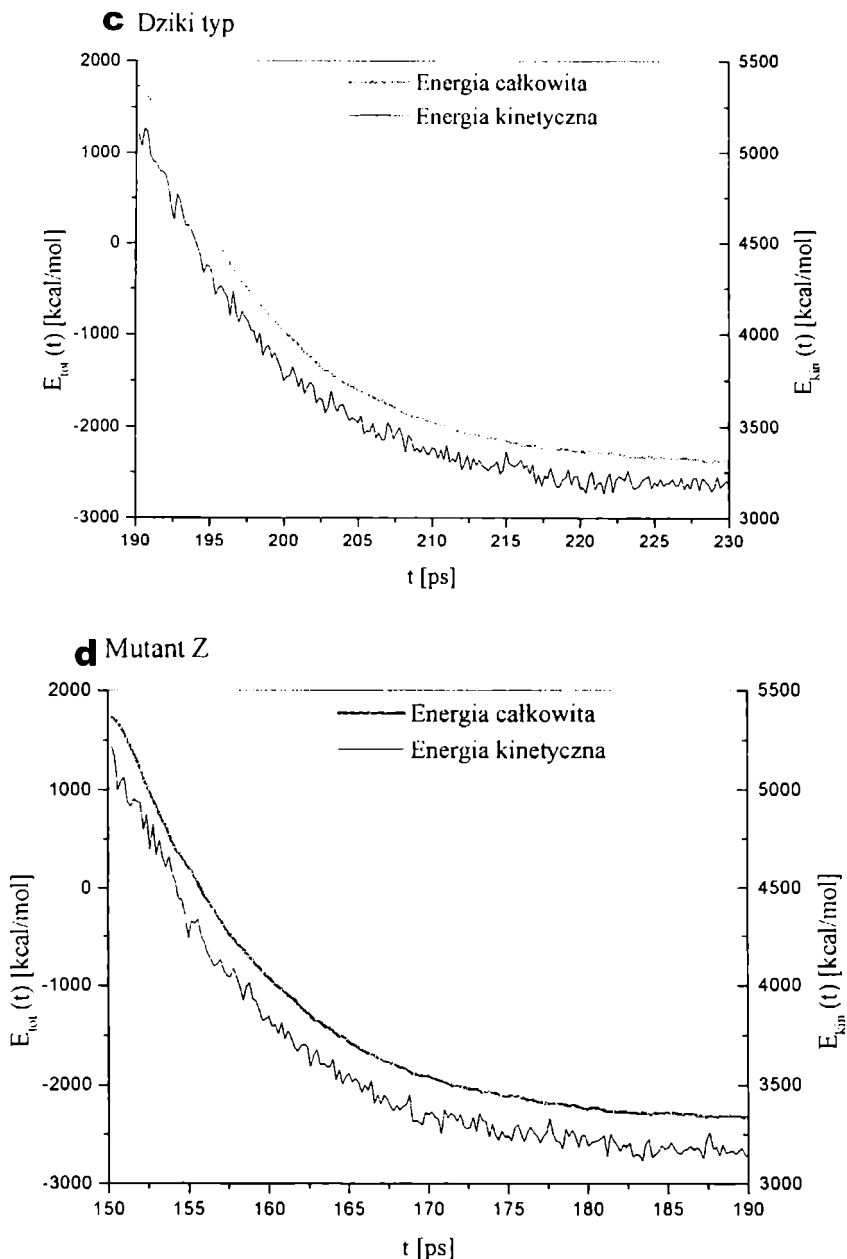
Przykładem wspomaganej komputerowo projektowania leków z zastosowaniem symulowanego wyżarzania jest praca Wanga i wsp. [35]. W symulacjach stosowane jest klasyczne pole siłowe AMBER [36] (różniące się w niewielkim stopniu od pola OPLS parametryzacją oddziaływań) oraz imitacja efektu rozpuszczalnika „stałą” dielektryczną zależną od odległości. Procedurę przeprowadzono następującymi etapami:

1. Przeszukiwanie różnych konformacji liganda; wstępna selekcja struktur do dalszej symulacji.
2. Dokowanie wybranych kandydatów w określonym obszarze białka (np. w centrum aktywnym w przypadku enzymu); kolejna selekcja struktur.

⁵Dokowanie polega na modelowaniu oddziaływania niewiążącego – kompleksu, między kilkoma cząsteczkami, z których co najmniej jedna jest makrocząsteczką; procedura polega przede wszystkim na tworzeniu wielu konfiguracji próbnych danego kompleksu. Praca Sternberga i in. [33] zawiera omówienie i przykładowe zastosowania metody dokowania.



RYSUNEK 3. Zależność energii całkowitej i kinetycznej od czasu: rysunki a i b przedstawiają wykresy energii całkowitej (jasna linia) oraz krzywą wygładzoną (ciemna linia) ilustrując m.in. okres fluktuacji energii. Energia dzikiego typu stabilizuje się szybciej niż mutantu (a), osiągając poziom ok. 1750 kcal/mol po 60 ps symulacji. Energia mutantu (b) jest w tym samym czasie wyższa o 100 kcal/mol oraz podlega większym fluktuacjom



RYSUNEK 3 cd. Rysunki c i d przedstawiają wykresy energii całkowitej (lewa oś rzędnych; linia gruba) i kinetycznej (prawa oś rzędnych; linia cienka) podczas etapu schładzania, dla struktur przyjętych za najbardziej optymalne. Końcowa wartość energii całkowitej dla typu dzikiego jest niższa o 40 kcal/mol od analogicznej wartości dla mutantu. Wartość początkowa na osi odciętych odnosi się do całkowitego czasu symulacji wybranych struktur przed rozpoczęciem schładzania; wynosi on 150 ps dla dzikiego typu i 190 ps dla mutantu Z

3. Minimalizacja energii liganda w miejscu wiążącym.
4. Systematyczna weryfikacja kolejnych konformerów w cząsteczce liganda, czyli skanowanie kątów dwuściennych (torsyjnych) różniących się wartościami tych kątów.
5. Symulowane wyżarzanie liganda w miejscu wiążącym (dla każdej z otrzymanych struktur); maksymalna temperatura symulacji wynosiła 773 K; czas symulacji: 4 ps.

Dwa ostatnie etapy powtarzano iteracyjnie, aż do osiągnięcia zadanej liczby różnych struktur.

Metodą tą zbadano w sumie 12 kompleksów białko-ligand, o liczbie możliwych rotacji wokół wiązań pojedynczych w ligandzie w zakresie od 3 dla kompleksu biotyny ze streptawidyną do 17 dla kompleksu proteazy HIV-1 ze związkiem VAC⁶.

Metoda symulowanego wyżarzania zastosowana została w połączeniu z symulacją dokowania, skanowania kątów dwuściennych oraz minimalizacji energii. Procedura, zastosowana do ligandów średniocząsteczkowych, pozwoliła na otrzymanie struktur kompleksów bliskich strukturom rozwiązany krystalograficznie – wartości średnich odchyłeń kwadratowych (RMSD) struktur symulowanych od doświadczalnych wynoszą od 0,62 do 2,01 Å, co oznacza dobrą zgodność z doświadczeniem. Dużą zaletą metody jest oszczędność czasu obliczeniowego; w niniejszym przykładzie zastosowań do projektowania leków symulowane wyżarzanie wraz z procedurami towarzyszącymi zajęło 10–40 minut na stacji roboczej SGI z procesorem R10000.

5. PODSUMOWANIE

Podstawowym celem stosowania symulowanego wyżarzania jest generowanie zespołu zróżnicowanych (kryterium RMSD), stabilnych energetycznie (wartość energii potencjalnej) struktur wykazujących zgodność z danymi doświadczalnymi. Symulowane wyżarzanie jest również dogodną metodą badania dynamiki układów molekularnych.

Niewątpliwą zaletą metody jest możliwość ograniczenia się do krótkich czasów symulacji w porównaniu z symulacją w temperaturach fizjologicznych oraz możliwość uzyskania wiarygodnych wyników bez zastosowania modelu rozpuszczalnika *explicit*. Do wad metody należą:

1. Trudności w obliczaniu dynamicznych wielkości fizycznych, takich jak stała dyfuzji.
2. Niedokładna i niesystematyczna penetracja przestrzeni konfiguracyjnej układu w interesującym nas obszarze (brak pewności co do weryfikacji wszystkich ważniejszych struktur – wysp stabilności).

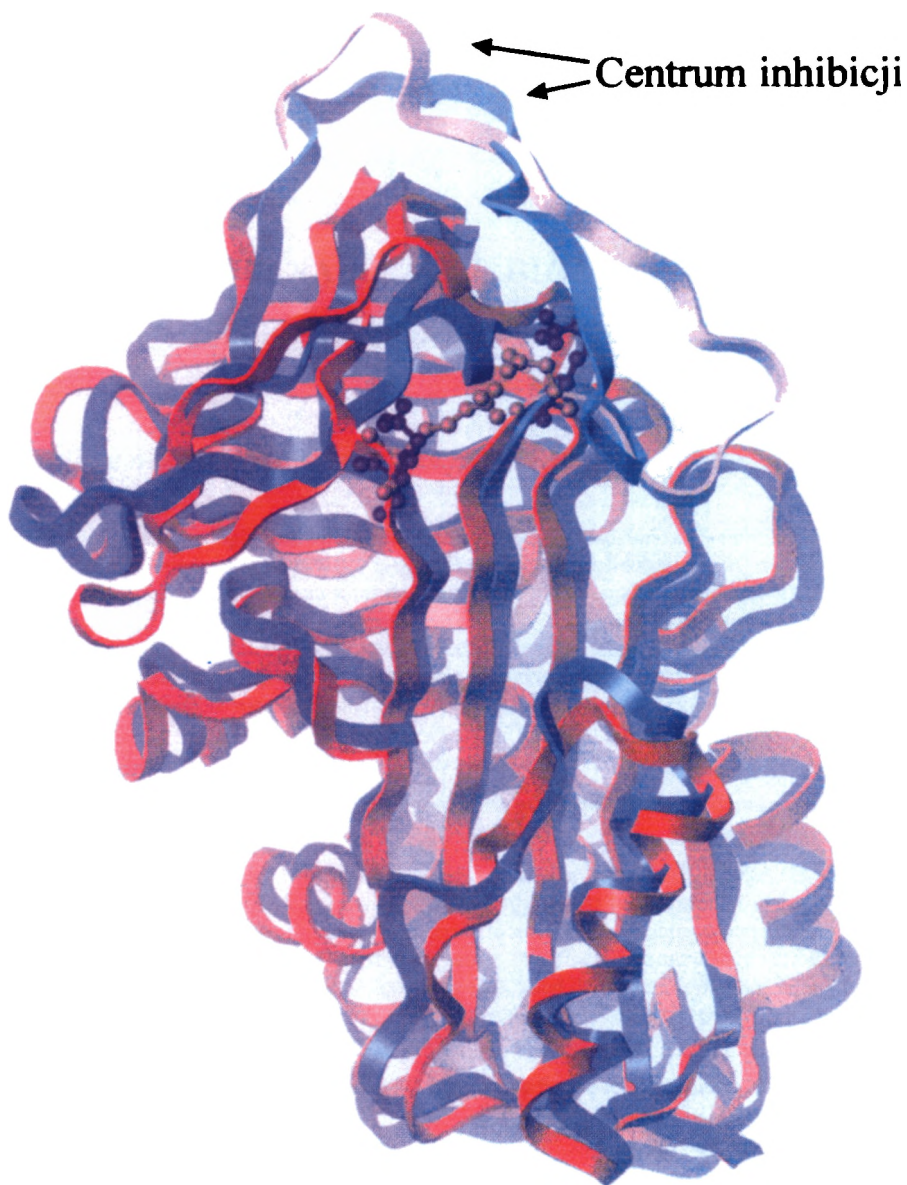
⁶Kody bazy danych *Protein Data Bank* odpowiednio: 1 stp i 4 phv.

Współczesne możliwości obliczeniowe nie pozwalają na symulację procesu re-aranżacji całego łańcucha białkowego, trwającego nawet kilkaset milisekund (np. zwijanie lizozymu). Co więcej, obecne symulacje dynamiki molekularnej w temperaturze fizjologicznej lub pokojowej nie pokrywają zwykle skal czasowych tworzenia domen z rozwiniętego łańcucha polipeptydowego, tj. ok. 10^{-4} – 10^{-3} sekundy. W tej sytuacji zastosowanie metody symulowanego wyżarzania jest obiecujące, ponieważ pozwala na dotarcie do odległych konformacji polipeptydu w stosunkowo krótkim czasie.

LITERATURA

- [1] ANSELM AI. Podstawy fizyki statystycznej i termodynamiki. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1980; rozdz. 4 § 5, str. 107 i nast.
- [2] BERENDSEN HJC, POSTMA JPM, VAN GUNSTEREN WF, DINOLA A, HAAK JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 1984; **81**: 3684–3690.
- [3] BOHM H-J, KLEBE G. What Can We Learn from Molecular Recognition in Protein-Ligand Complexes for the Design of New Drugs? *Angew Chem Int Ed Engl* 1996; **35**: 2588–2614.
- [4] BRUNGER A, KRUKOWSKI A, ERICKSON JW. Slow-Cooling Protocols for Crystallographic Refinement by Simulated Annealing. *Acta Cryst* 1990; **A46**: 585–593.
- [5] BUCHLER NEG, ZUIDERWEG ERP, WANG H, GOLDSTEIN RA. Protein Heteronuclear NMR Assignments Using Mean-Field Simulated Annealing. *J Magn Res* 1997; **125**: 34–42.
- [6] DUNSTONE MA, DAI W, WHISSTOCK JC, ROSSJOHN J, PIKE RN, FEIL SC, LE BONNIEC BF, PARKER MW, BOTTOMLEY SP. Cleaved antitrypsin polymers at atomic resolution. *Protein Sci* 2000; **9**: 417–420.
- [7] ELLIOTT PR, ABRAHAMS JP, LOMAS DA. Wild-type α_1 -antitrypsin is in the canonical inhibitory conformation. *J Mol Biol* 1998; **275**: 419–425.
- [8] GETTINS PGW, PATSTON PA, OLSON ST. Serpins: structure, function and biology. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 1996.
- [9] HOLADAY SK, MARTIN BM, FLETCHER PL, KRISHNA NR. NMR solution structure of butantoxin. *Arch Biochem Biophys* 3 2000; **79**: 18–27.
- [10] HUNTINGTON JA, PANNU NS, HAZES B, READ RJ, LOMAS DA, CARRELL RW. A 2.6 Å Structure of a Serpin Polymer and Implications for Conformational Disease. *J Mol Biol* 1999; **293**: 449–455.
- [11] JEZIERSKI G. Modelowanie molekularne oddziaływania trp represor-DNA. *Post. Biol. Kom* 1997; **24**, suppl. 8: 21–36.
- [12] JEZIERSKI G, PASENKIEWICZ-GIERULA M. The effect of the Glu342Lys mutation in α_1 -antitrypsin on its structure and dynamics, studied by molecular modelling methods. 2000; w przygotowaniu.
- [13] JORGENSEN WL, TIRADO-RIVES J. The OPLS Potential Functions for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. *J Am Chem Soc* 1988; **110**: 1657–1666.
- [14] KARPLUS M, MCCAMMON JA. Protein structural fluctuations during a period of 100 ps. *Nature* 1979; **277**: 578.
- [15] KARTHIKEYAN S, YADAV S, PARAMASIVAM M, SRINIVASAN A, SINGH TP. Structure of buffalo lactoferrin at 3.3 Å resolution at 277 K. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2000; **56 Pt 6**: 684–689.
- [16] KIRKPATRICK S, GELATT CD JR, VECCHI MP. Optimization by Simulated Annealing. *Science* 1983; **220**: 671–680.

- [17] KOLOCZEK H, BANBULA A, SALVESEN GS, POTEMPA J. Serpin alpha1-proteinase inhibitor probed by intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy. *Protein Sci* 1996; **5**: 2226–2235.
- [18] KOLOCZEK H, GUZ A, KASZYCKI P. Fluorescence detected polymerisation kinetics of Human alpha1-Antitrypsin. *J Protein Chem* 1996; **15** : 447–454.
- [19] LESYNG B, MCCAMMON JA. Molecular Modeling Methods. Basic Techniques and Challenging Problems *Pharmac Ther* 1993; **60**: 149–167.
- [20] LI Z, SCHERAGA HA. Monte Carlo minimization approach to the multiple minima problem in protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 6611–6615.
- [21] LI H, TEJERO R, MONLEON D, BASSOLINO-KLIMAS D, ABATE-SHEN C, BRUCCOLERI RE, MONTELIONE GT. Homology modeling using simulated annealing of restrained molecular dynamics and conformational search calculations with CONGEN: Application in... *Protein Sci* 1997; **6**: 956–970.
- [22] LOEBERMANN H, TOKUOKA R, DEISENHOFER J, HUBER R. Human α_1 -proteinase inhibitor. Crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary analysis of the implications for function. *J Mol Biol* 1984; **177**: 531–556.
- [23] LOMAS DA, ELLIOTT PR, SIDHAR SK, FOREMAN RC, FINCH JT, COX DW, WHISTOCK JC, CARRELL RW. α_1 -Antitrypsin Mmalton (Phe52-deleted) Forms Loop-Sheet Polymers *in Vivo*. *J Biol Chem* 1995; **270** (28): 16864–16870.
- [24] MCCAMMON JA, WOLYNES PG, KARPLUS M. Picosecond dynamics of tyrosine side chains in proteins. *Biochemistry* 1979; **18**: 927–942.
- [25] MEIROVITCH H, VASQUEZ M. Efficiency of simulated annealing and the Monte Carlo minimization method for generating a set of low energy structures of peptides. *J Mol Struct (Theochem)* 1997; **398-399**: 517–522.
- [26] METROPOLIS N, ROSENBLUTH AW, ROSENBLUTH MN, TELLER AH, TELLER E. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *J Chem Phys* 1953; **21**: 1087–1092.
- [27] OKAMOTO Y. β -sheet formation in BPTI(16-36) by Monte Carlo simulated annealing. *Chem Phys Lett* 1999; **299**: 17–24.
- [28] PEARLMAN DA, CASE DA, CALDWELL JC, SEIBEL GL, SINGH UC, WEINER P, KOLLMAN PA. AMBER 4.0. University of California, San Francisco 1991.
- [29] POTEMPA J. Struktura, funkcja i ewolucja serpin, rozprawa habilitacyjna, UJ, Kraków, 1993.
- [30] QI PX, DI STEFANO DL, WAND AJ. Solution Structure of Horse Heart Ferrocycytochrome c Determined by High-Resolution NMR and Restrained Simulated Annealing. *Biochemistry* 1994; **33**: 6408–6417.
- [31] RAY JR, HARRIS RW. Simulated annealing in the microcanonical ensemble. *Physical Review E* 1997; **55** (5): 5270–5274.
- [32] SONG HK, LEE KN, KWON K, YU M, SE WS. Crystal structure of an uncleaved α_1 -anti-trypsin reveals the conformation of its inhibitory reactive loop. *FEBS Lett* 1995; **377**: 150–154.
- [33] STERNBERG MJE, GABB HA, JACKSON RM. Predictive docking of protein-protein and protein-DNA complexes. *Curr Opin Struct Biol* 1998; **8**: 250–256.
- [34] TEJERO R, BASSOLINO-KLIMAS D, BRUCCOLERI RE, MONTELIONE GT. Simulated annealing with restrained molecular dynamics using CONGEN: Energy refinement of the NMR solution structures of epidermal and type-alpha. *Protein Sci* 1996; **5**: 578–592.
- [35] WANG J, KOLLMAN PA, KUNTZ ID. Flexible Ligand Docking: A Multistep Strategy Approach. *Proteins* 1999; **36**: 1–19.
- [36] WEINER SJ, KOLLMAN PA, CASE DA, SINGH UC, GHIO C, ALAGONA G, PROFETA S JR, WEINER P. A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins. *J Am Chem Soc* 1984; **106**: 765–784.



RYSUNEK 4. Struktury α_1 -antytrypsyny po przeprowadzeniu symulowanego wyżarzania i minimalizacji energii – nałożenie struktury dzikiego typu (kolor czerwony) i mutantu Z (kolor niebieski). Parę Glu342-Lys290 w białku niezmutowanym, charakteryzującą się trwałym oddziaływaniem oraz aminokwasy Lys342 i Lys290 w mutancie Z przedstawiono w projekcji kijków. Pętla reaktywna zaznaczona jest jaśniejszymi odcieniami. Odcinek pętli reaktywnej stanowiący centrum reakcji inhibicji proteazy (projekcja kijków) zaznaczono elipsą